

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/569, 33/574, C07K 14/025	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/10744 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. März 1999 (04.03.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04773 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1998 (30.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 37 409.3 27. August 1997 (27.08.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEDI- GENE AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE KARDIOLOGIE UND ONKOLOGIE [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖPFL, Reinhard [AT/AT]; Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck (AT). (74) Anwälte: DIEHL, Hermann, O., Th. usw.; P.O. Box 34 01 15, D-80098 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: DIAGNOSTIC KIT FOR SKIN TESTS, AND METHOD (54) Bezeichnung: DIAGNOSEKIT FÜR HAUTTEST UND VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG DESSELBEN (57) Abstract A skin test was developed to determine the immune status with regard to viral proteins E6 and E7 from the human papillomavirus. For that purpose, a diagnostic kit is provided which contains an active amount or at least an immunologically active fraction of the proteins E6 and/or E7. Said test consists in intracutaneous application of the protein E6/E7 and visual examination of the skin portion concerned in an attempt for detecting red spots. (57) Zusammenfassung Ein Hauttest zur Bestimmung des Immunstatus bezüglich der transformierenden Virusproteine E6 und E7 von humanen Papillomaviren wird bereitgestellt. Der Hauttest beinhaltet ein Diagnosekit, das eine wirksame Menge des Proteins E6 und/oder E7 oder zumindest eines immunologisch wirksamen Teils von E6 und/oder E7 enthält. Der Hauttest wird durchgeführt, indem das Protein E6/E7 aus dem Diagnosekit intrakutan appliziert und die betreffende Hautstelle visuell inspiziert wird, um Rötungen festzustellen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Diagnosekit für Hauttest und Verfahren zur Durchführung desselben

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Hauttest zum Feststellen des Immunstatus gegen humane Papillomaviren.

10

Humane Papillomaviren (HPV) sind mit malignen Karzinomen des Anogenitaltrakts, speziell des Cervix uteri, der Vulva, des Penis und des Analkanals, eng verbunden. "High-risk" HPV Typen - wie z.B. HPV16 - transformieren Keratinozyten mittels der in ihnen enthaltenen viralen Onkoproteine E6 und E7 durch Inaktivierung von Tumorsuppressor-Proteinen. Hierbei wird davon ausgegangen, daß die beiden Onkoproteine E6 und E7 kooperativ an der Immortalisierung beteiligt sind (Hawley-Nelson, EMBO J., 8, 3905 (1989)).

15

20

Die durch HPV transformierten Krebszellen exprimieren auch noch in fortgeschrittenen Tumorstadien die viralen Proteine E6 und E7. Es wird vermutet, daß eine spontane oder eine durch Impfung induzierte Immunreaktion gegen diese Proteine zur Rückbildung von durch HPV bedingten Tumoren führen könnte. Bisher wurden Patienten oder Patientinnen mit spontaner Rückbildung ihrer Erkrankung nicht untersucht, weil Untersuchungen der zellulären Abwehrreaktion *in vitro* äußerst zeitaufwendig und trotzdem relativ wenig empfindlich sind. Die Rolle der zellulären Immunantwort bei Impfungen gegen HPV-assoziierte Läsionen ist unklar.

25

30

35

Hauttestungen werden teilweise bereits im klinischen Bereich in der Allergologie und bei Infektionskrankheiten (in erster Linie bei der Abklärung der Tuberkulose in Form des bekannten TINE-Tests) eingesetzt. Für virologische Fragestellungen oder für die Krebsforschung gab es jedoch bisher praktisch keine spezifische Anwendung.

Hauttestungen sind auch für wissenschaftliche Fragestellungen ein hervorragendes Werkzeug und zur raschen und praktikablen Erfassung komplexer zellulärer Immunreaktionen *in vivo* geeignet. Ein Hauttest zur Untersuchung der zellulären Immunreaktion gegen "high risk" HPV ist im Stand der Technik vorbekannt. Diese erste Anwendung des Hauttests zur Feststellung einer Immunreaktion gegen ein krebsassoziiertes Virus wurde mit dem Hüllprotein L1 des "high risk" HPV Typ 16 durchgeführt (Gebrauchsmuster G9106105.9) und in der Folge in Tiermodellen angewandt.

Ein Modell für den Hauttest gibt es auch bei der Maus; es wurde dabei die Immunreaktion auf ein transplantiertes Antigen untersucht (McLean et al. J. Gen. Virol. 74, 239-245 (1993)).

Dieser vorbekannte Hauttest erfaßte nicht die humorale Immunantwort auf eine HPV-Infektion. Im Gegensatz zur zellulären Abwehr ist die Erfassung der humoralen Immunreaktion relativ einfach im Labor mittels serologischer Tests durchführbar. Es gilt als bewiesen, daß Antikörper gegen dreidimensional intakte Strukturen der Virushüllproteine Papillomaviren neutralisieren können (Christensen et al. J Gen Virol 75, 2271 (1994)). Antikörper gegen die frühen Proteine E6 und E7 sind mit malignen Tumoren der Cervix uteri assoziiert (Jochmus-Kudielka et al. J. Natl. Cancer Inst. 81, 1698 (1989)).

Eine prophylaktische Impfung mit aus Hüllproteinen bestehenden "virus like particles" würde eine HPV-Infektion und das damit verbundene Krebsrisiko vorbeugend reduzieren. Die humorale Immunantwort gegen HPV spielt aber keine Rolle bei der Rückbildung von bereits bestehenden Läsionen. Die Serologie hat daher epidemiologische Bedeutung.

Zusammenfassend zeigen die Experimente in Tiermodellen und bei Patientinnen, daß zelluläre Immunreaktionen gegen virale Proteine durch Hauttestung nachweisbar sind. Aufgrund der Daten kann vermutet werden, daß eine Immunreaktion gegen das Hüllprotein L1 nicht mit Regression einhergeht, da in fortgeschrittenen Läsionen intakte Viruspartikel nicht mehr gebildet werden. Daher sind die transformierenden Virusproteine E6 und E7 das wahrscheinliche Ziel einer "heilenden" Immunreaktion. Diese Tumorantigene sind somit potentielle Kandidaten für die Entwicklung eines Impfstoffs, wenn zusätzlich zur prophylaktischen Wirksamkeit durch Virushüllproteine eine therapeutische Effektivität erzielt werden soll. Es wird angenommen, daß durch eine solche Impfung zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen gegen persistent infizierte Genitalläsionen aktiviert werden.

Ein *in vivo* Test, um den Erfolg einer solchen Impfung gegen E6 und/oder E7 anhand der vom Immunsystem als Reaktion auf die Impfung zellulären Abwehrreaktion nachzuweisen, ist jedoch bislang nicht bekannt.

Aufgabe der Erfindung ist daher, die Bereitstellung eines Tests, mit dem der Immunstatus gegen E6- und/oder E7-Proteine von Papillomaviren *in vivo* auf einfache Weise festgestellt werden kann. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung des Diagnosekits für Hauttests gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 1 sowie das Verfahren zur Durchführung eines Hauttests gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 10 gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen und Aspekte der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen und der Beschreibung.

Der erfindungsgemäße Hauttest kann auch zum Nachweis spontaner Regressionen von Papillomaviruskarzinomvorläufern (CIN) eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt kann der erfindungsgemäße Hauttest auch im Bereich der Forschung eingesetzt werden, um Mechanismen bei der Rückbildung von durch HPV bedingten Läsionen zu untersuchen.

5

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand eines Beispiels erläutert, bei dem die prinzipielle Eignung des Hauttests für die Überprüfung von Impferfolgen anhand von nicht geimpften Patientinnen, die jedoch zum Teil spontane Regressionen der Zervixkarzinome und Vorläufer derselben, und somit eine dem Impferfolg gleichzusetzende Eigenschaft aufwiesen, gezeigt wird. Es wurden synthetische Peptide für den Hauttest gegen HPV16-E6 oder -E7 verwendet. Diese bieten gegenüber der Verwendung von nativen Proteinen oder Fusionsproteinen den Vorteil, daß eine Verunreinigung mit DNA ausgeschlossen werden konnte, da synthetische Peptide mit absoluter Sicherheit frei von problematischer Kontamination mit DNA sind.

10

15

20

25

30

35

Eine beispielhafte Hauttestung mit den Peptidantigenen für das Onkoprotein HPV16-E7 wurde bei Patientinnen durchgeführt. Es konnte überraschend gezeigt werden, daß erstens eine zelluläre Immunreaktion gegen das virale Onkoprotein HPV16-E7 *in vivo* erfaßbar ist und zweitens synthetische Peptide Proteine für Hauttestungen ersetzen können. Drittens konnte eine Assoziation einer positiven Hauttestreaktion im Sinne einer "delayed type hypersensitivity" mit Regression zervikaler Krebsvorläufer beobachtet werden. Eine solche Korrelation ist nicht vorbekannt. Die Beobachtung untermauert die potentielle Bedeutung des Antigens HPV16-E7 in einem therapeutisch wirksamen Impfstoff und zeigt die Verwendbarkeit des erfindungsgemäßen Hauttests für die Bestimmung des Immunstatus bezüglich E6 und E7.

Für die Ausführung des erfindungsgemäßen Beispiels wurden fünf einander überlappende, relativ lange Peptide aus je ca.

30 Aminosäuren für das Onkoprotein HPV16-E7 und ein Kontrollpeptid zufälliger Sequenz gleicher Länge verwendet. Die Sequenz für die 98 Aminosäuren des HPV16-E7-Proteins ist bekannt (Seedorf et al. J. Gen. Virol., 71, 2719 (1990)). Die Peptide wurden am Dep. IHB/AZL (Leiden, Holland) in einem "multiple peptide synthesizer" hergestellt. Die Peptide wurden mit Hilfe der "Fmoc"-Technologie synthetisiert, mittels Äther aus Trifluorsäure präzipitiert und anschließend lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde mittels "reverse phase high pressure liquidchromatography" überprüft. Peptide zum Einsatz mit dem erfindungsgemäßen Hauttest können jedoch auch auf andere, Fachleuten geläufige Weise hergestellt werden.

Die im Einbuchstaben-Code angegebenen Sequenzen für die einzelnen getesteten Peptide waren:

1. MHGDTPTLHEFYMLDLQPETTDLYCYEQQLND
2. DLYCYEQQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
3. PAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRLCVQ
4. CDSTLRRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGLGIV
5. STHVDIRTLEDLLMGTGLGIVCPICSQKP

sowie als Kontrollpeptid:

6. SENKELKKAIDGLQGLLLGLRQRIETLEGK

Der Einbuchstaben-Code der Aminosäuren ist beispielsweise in Römpps Chemie Lexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band 1, Seite 160/161, (1989) erläutert.

Für die Hauttestung wurden die Peptide nach Sterilitätsüberprüfung und Pyrogentest in einer Konzentration von 1 mg/ml in 70% Glycerin gelöst und etwa 0,01 ml dieser Lösung streng intrakutan in die oberste Dermis und die Epidermis der Testpersonen injiziert. Jedes Peptid wurde

getrennt (5 HPV16-E7-Peptide + 1 Kontrollpeptid) eingesetzt. Es versteht sich jedoch, daß auch Kombinationen der Peptide untereinander oder/und mit entsprechenden Peptiden von HPV E6 verwendet werden können. Parallel zur Hauttestung mit E7-Antigenen wurde zumeist die allgemeine Abwehrlage gegen klassische Recall-Antigene mit einem Immunblock, z.B. Mérieux-Multitest "Sero", Testsystem mit 7 Antigenen und einer Kontrolle zur Bestimmung des Status der zellvermittelten Immunität, hergestellt vom serotherapeutischen Institut Wien GmbH in Lizenz von Pasteur Merieux S.V., Lyon, Frankreich, bestimmt. Als positiv wurden Reaktionen mit einer rötlichen Papelbildung mit mindestens 2 mm Durchmesser gewertet.

Die Hauttestung wurden an insgesamt 19 Patientinnen mit prämaligen oder malignen HPV bedingten Läsionen ausgeführt. Solche Erkrankungen sind mit einer Wahrscheinlichkeit von in etwa 50% durch den HPV-Typ 16 verursacht, in weiteren 40% der Fälle sind andere "high risk"-HPV-Typen anzunehmen:

Zwölf Patientinnen mit höhergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (ZIN III), davon 4 mit Regressionshinweis zum Zeitpunkt der Untersuchung (spontaner Rückgang von Pap III D auf Pap II)

Sieben Patientinnen mit Zevixkarzinomen.

Somit wurden 19 Patientinnen getestet, von denen 4 Regressorinnen und 15 Progressorinnen waren.

Als Kontrollpersonen wurden zwei Männer ohne Hinweis auf HPV16-Infektion verwendet.

Begleitend wurden die hautgetesteten Personen serologisch mittels ELISA mit "virus like partikles (VLPs)" als Antigen auf neutralisierende Antikörper gegen HPV 16 in Fachleuten geläufiger Art und Weise untersucht. Serologische

Untersuchungen sind für den spezifischen Hauttest selbst nicht nötig, wurden jedoch im Beispiel zur Erweiterung der wissenschaftlichen Aussagekraft der Ergebnisse mit durchgeführt. Abstrich- oder Biopsiematerial der Läsionen wurde für spätere Virustypisierung mittels PCR bei -80°C eingelagert, vorerst wurde mit dot blot (ViraType, Digene Diagnostics, Silver Spring, MD) auf die HPV-6/11, -16/18 und -31/33/35 untersucht. Eine Lymphozytenbank für ergänzende in vitro Untersuchungen wurde angelegt.

Die Regressorinnen (4/4) zeigten eine mäßige (1 Fall) bis starke (3 Fälle) Immunreaktion gegen einzelne Peptide des Onkoproteins E7. Bei den 15 Progressorinnen und bei beiden Kontrollpersonen fand sich keine eindeutige Reaktivität im Hauttest. Der Verlauf der Hauttestreaktion war im Vergleich zu einer klassischen Tuberkulinreaktion deutlich verzögert. Ablesungen waren deshalb meist eine Woche nach der Testung am besten möglich. Reaktionen auf das Kontrollpeptid fanden sich in keinem Fall.

Die Reaktionen wurden fotodokumentiert, eine Reaktion wurde biopsiert und histologisch untersucht. Ähnlich wie schon bei früheren Hauttestungen mit L1 beobachtet, fand sich ein lymphozytäres Infiltrat, welches mit einer "delayed type hypersensitivity reaction" vereinbar erschien. Antikörper gegen HPV16-L1 fanden sich in 4 der 7 Patientinnen mit Zervixkarzinom und bei nur einer Patientin mit CIN. Zusammenfassend ging somit der Antikörpernachweis gegen HPV16-L1-VLPs offensichtlich eher mit einer Progression einher, während eine zelluläre Immunreaktion gegen HPV16-E7 im Hauttest mit der Rückbildung präkanzeröser zervikaler Läsionen assoziiert war.

Die Ergebnisse belegen die Wirksamkeit des Hauttests zum empfindlichen Nachweis einer zellulären Immunreaktion gegen HPV16-E7, die bei den untersuchten Fällen mit spontaner

Rückbildung einer HPV-assoziierten Krebsvorläuferläsion einherging.

5 Da mit dem beschriebenen Hauttest eine Immunreaktion erfaßt wurde, die mit Regression von Krebsvorläuferläsionen assoziiert war, kann der Hauttest als Instrument zur Kontrolle eines Impferfolges gegen E6 und/oder E7 eingesetzt werden. Ein breit angelegtes Screening mittels Hauttestung zur Aufklärung der Mechanismen einer immunologisch mediierten
10 Tumorrückbildung ist ebenfalls möglich. Aufgrund des extrem hohen Aufwandes für *in vitro* Experimente ist die Untersuchung einer zellulären Immunität bei einer großen Zahl von Patienten durch Laboruntersuchungen kaum möglich. Im Rahmen zukünftiger Impfstudien mit einer hypothetisch therapeutisch
15 wirksamen Vakzine gegen das Zervixkarzinom durch Immunisierung gegen das Tumorprotein HPV16-E7 ist der erfindungsgemäße Hauttest eine ideale, weil praktikable und sensitive Methode, um das gewünschte Ansprechen des zellulären Immunsystems auf die Impfung zu erfassen.

20 Im obigen Beispiel wurden die verwendeten Peptide in 70% Glycerin gelöst. Glycerin ist bevorzugt, da es eine für die intrakutane Applikation geeignete Viskosität aufweist und zudem desinfizierend wirkt. Erfindungsgemäß können jedoch
25 auch andere geeignete Lösungsmittel verwendet werden, unter Umständen muß aufgrund des Löseverhaltens eines Peptids dieses in einer speziell angepaßten Lösung gelöst werden. Den erfindungsgemäß verwendeten Lösungsmitteln können auch weitere Additive zugesetzt sein, wie Emulgatoren, Chelatoren,
30 Desinfektionsmittel u.a.

Der Hauttest kann durch intrakutane Injektion einer wirksamen Menge an gelöstem E6- und/oder E7-Antigen mittels einer Spritze durchgeführt werden. Demzufolge enthielte das
35 Diagnosekit eine oder mehrere Ampullen, Spritzen und Kanülen. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung von speziell für

Hauttestungen entwickelten Applikatoren möglich und bevorzugt, wie etwa der Multitest "SERO"-Teststempel von Sero-Mérieux (siehe oben) oder der Stempel für den TINE-Test. Das erfindungsgemäße Diagnosekit kann demzufolge Ampullen mit
5 Antigen(en) und/oder Applikatoren enthalten.

Im obigen Beispiel wurde anhand von HPV16-E7 die Wirkungsweise des erfindungsgemäßen Hauttests beschrieben. Es kann jedoch auch E6 verwendet werden. Ebenso ist es möglich,
10 den Hauttest durch die Verwendung von E6 und/oder E7 anderer HPV-Typen zur Erkennung einer Immunantwort gegenüber diesen Stämmen einzusetzen. Durch den nahen Verwandtschaftsgrad verschiedener HPV-Typen ist es schließlich auch möglich, Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen HPV-Typen auszunutzen,
15 um einen universelleren Hauttest gegen verschiedene HPV-Typen gleichzeitig einzuführen.

Die für eine sichtbare Immunreaktion notwendig applizierte Menge von Antigenen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Sie
20 kann daher erfindungsgemäß zwischen 0,01 und 10 µg, vorzugsweise zwischen 0,05 und 5 µg Antigen pro Applikation liegen. Hierbei ist für die Zusammenstellung von Antigenlösungen für Diagnosekits zu beachten, daß nur ein Teil der Lösung in den intrakutanen Bereich gelangt, während
25 ein anderer Teil auf der Haut des Probanden verlorengehen kann oder in der Lösungsampulle zurückbleibt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: MediGene AG
(B) STRASSE: Lochhamer Str. 11
(C) ORT: Muenchen
(D) BUNDESLAND: Bayern
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 81927
(G) TELEFON: +49-89-8956320
(H) TELEFAX: +49-89-89563220

(A) NAME: Dr. Reinhard Hoepfl
(B) STRASSE: Anichstr. 35
(C) ORT: Innsbruck
(E) LAND: Oesterreich
(F) POSTLEITZAHL: 6020

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Diagnosekit fuer Hauttest und Verfahren zur Durchfuehrung desselben

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met	His	Gly	Asp	Thr	Pro	Thr	Leu	His	Glu	Tyr	Met	Leu	Asp	Leu	Gln
1				5					10					15	
Pro	Glu	Thr	Thr	Asp	Leu	Tyr	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp		
		20						25					30		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp
1 5 10 15
Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr
1 5 10 15
Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile
1 5 10 15
Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 28 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

12

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ser	Thr	His	Val	Asp	Ile	Arg	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Met	Gly	Thr
1			5					10						15	
Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro															
20 25															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Ser	Glu	Asn	Lys	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu
1			5					10						15	
Leu Leu Gly Leu Arg Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Gly Lys															
20 25 30															

**Diagnosekit für Hauttest und Verfahren zur Durchführung
desselben**

Patentansprüche

- 5
1. Hauttest-Diagnosekit zum Nachweis einer Immunreaktion
gegen das Onkoprotein E6 und/oder E7 eines
Humanpapillomavirentyps, wobei das Diagnosekit eine
wirksame Menge des Onkoproteins E6 und/oder E7 und/oder
10 mindestens eines immunologisch wirksamen Teils von E6
und/oder E7 eines Humanpapillomavirustyps enthält.
 2. Diagnosekit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
der enthaltene Teil des Onkoproteins aus HPV16 entstammt.
 - 15 3. Diagnosekit gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß der immunologisch wirksame Teil des
Humanpapillomavirustyps mindestens ein synthetisch
hergestelltes Peptid ist.
 - 20 4. Diagnosekit gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das enthaltene Onkoprotein E7
oder der immunologisch Teil wirksame desselben aus HPV16
ist oder sind.
 - 25 5. Diagnosekit gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das enthaltene Onkoprotein
oder der immunologisch wirksame Teil desselben in einem
Lösungsmittel gelöst ist.
 - 30 6. Diagnosekit gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß
das Lösungsmittel 70% Glycerin ist.
 - 35 7. Diagnosekit gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Menge an Onkoprotein oder

des immunologisch wirksamen Teils 0,01 bis 10 µg pro zu applizierender Charge beträgt.

- 5 8. Diagnosekit gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Diagnosekit weiterhin einen Applikator umfaßt, mit dem die wirksame Menge des Onkoproteins oder des immunologisch wirksamen Teils desselben intrakutan injizierbar ist.
- 10 9. Diagnosekit gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Applikator eine Spritze ist.
- 15 10. Diagnosekit gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Applikator ein Teststempel ist, wie er beispielsweise für den TINE-Test oder den Multitest "Sero" zum Einsatz kommt.
- 20 11. Verfahren für die Durchführung eines Hauttests zum Bestimmen einer Immunantwort gegenüber den Onkoproteinen E6 und/oder E7 eines HPV-Typs mit den folgenden Schritten:
- 25 a) Bereitstellen eines Diagnosekits gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9;
- b) intrakutanes Applizieren einer wirksamen Menge zumindest eines Onkoproteins E6 und E7 oder wirksamer Teile derselben in eine Testperson;
- 30 c) nach einer hinreichenden Inkubationszeit visuelles Inspizieren der Hautstellen der Applikation, um eine Immunantwort festzustellen.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die visuelle Inspektion der Hautstelle eine Woche nach der Applikation des Onkoproteins erfolgt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/569 G01N33/574 C07K14/025

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 91 06 105 U (BEHRINGWERKE AG) 26 September 1991 see example 1	1-12
Y	MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 91073133; see abstract XP002090517 & M. MULLER ET AL.: "Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 protein E4, E6, E7 and L1" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 71, 1990, pages 2709-2717, Oxford UK	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 January 1999

Date of mailing of the international search report

01/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04773

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 9106105 U	26-09-1991	CA 2047142 A	18-11-1992
		JP 7280810 A	27-10-1995
		US 5665533 A	09-09-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 98/04773

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/569 G01N33/574 C07K14/025

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 91 06 105 U (BEHRINGWERKE AG) 26. September 1991 siehe Beispiel 1	1-12
Y	MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 91073133; see abstract XP002090517 & M. MULLER ET AL.: "Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 protein E4, E6, E7 and L1" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 71, 1990, Seiten 2709-2717, Oxford UK	1-12

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04773

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 9106105 U	26-09-1991	CA 2047142 A	18-11-1992
		JP 7280810 A	27-10-1995
		US 5665533 A	09-09-1997